

## همسانه سازی، بررسی بیوانفورماتیکی و بیان ژن زیر واحد اصلی فاکتور کلونیزاسیون I/شرشیاکولی انتروتوکسیژنیک (ETEC)

زهرا احصایی<sup>۱</sup>، جعفر سلیمیان\*<sup>۱</sup>، شهرام نظریان<sup>۱</sup>، راضیه خالصی<sup>۱</sup>، غلامرضا اولاد<sup>۱</sup>، جعفر امانی<sup>۱</sup>

گروه علوم زیستی - دانشگاه امام حسین (ع)، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۸۹/۹/۲ اصلاح نهایی: ۸۹/۱۱/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۰/۲/۱۰

### چکیده:

زمینه و هدف: شرشیاکولی انتروتوکسیژنیک (ETEC) عامل اصلی اسهال کودکان در کشورهای در حال توسعه و مسافران به این مناطق می باشد. از طریق ساختارهای سطحی به نام فاکتورهای کلونیزاسیون به سلول های میزبان متصل می شود. شرشیاکولی انتروتوکسیژنیک در بسیاری از مناطق شیوع فاکتور کلونیزاسیون نوع یک (CFA/I) از سایر فاکتورهای کلونیزاسیون بیشتر می باشد و این ترکیب به عنوان ترکیب کلیدی در تولید واکسن محسوب می گردد. مولکول کد کننده زیر واحد اصلی آنتی ژن فاکتور کلونیزاسیون (CfaB) به عنوان زیر واحد اصلی این فیمبریه کاندیدی مناسبی برای واکسن می باشد. این مطالعه با هدف همسانه سازی ژن CfaB و بررسی تولید پروتئین نو ترکیب انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی اطلاعات مربوط به ژن فاکتور کلونیزاسیون CfaB از بانک ژن استخراج شد و پرایمرهای مناسب آن طراحی شدند. با استفاده از واکنش PCR، ژن مورد نظر تکثیر و سپس درون ناقل همسانه سازی (pTZ57R/T) و سپس در ناقل بیانی (pET28a(+)) همسانه سازی شد و بیان ژن CfaB مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: صحت همسانه سازی با استفاده از واکنش هضم آنزیمی و تعیین توالی تایید شد. بیان این توالی در شرایط مختلف مانند دما، میزبان و محیط کشت های مختلف بررسی گردید اما توالی طبیعی در pET 28a بیان نداشت.

نتیجه گیری: در طول توالی ژن کد کننده زیر واحد اصلی آنتی ژن فاکتور کلونیزاسیون کدون های نادر پشت سرهم وجود دارد که باعث کاهش بیان این پروتئین می شود.

واژه های کلیدی: شرشیاکولی انتروتوکسیژنیک، زیر واحد اصلی فاکتور کلونیزاسیون نوع I (CfaB)، همسانه سازی.

### مقدمه:

زلزله سلامت افراد را به خطر می اندازد (۳،۲). با توجه به اهمیت این بیماری در ایجاد تلفات انسانی و زیان های اقتصادی زیاد در جوامع، سازمان بهداشت جهانی درصدد راهکارهای تولید واکسن مناسب علیه این ارگانیسم می باشد (۱).

مرحله مهم بیماری زایی ETEC، توانایی چسبیدن و کلونیزه شدن این ارگانیسم به مخاط روده کوچک از طریق فاکتورهای کلونیزاسیون یا فیمبریه می باشد. این ارگانیسم با کلونیزه شدن در سطح روده

شرشیاکولی انتروتوکسیژنیک (ETEC) اصلی ترین مشکل سلامت در کشورهای در حال توسعه محسوب می شود (۱). اسهال ناشی از ETEC در میان نوزادان و مسافران، به ویژه در کشورهای جهان سوم که از امکانات بهداشتی و درمانی پایینی برخوردار بوده شیوع گسترده ای دارد (۲). بیماری اسهالی مربوطه سالانه ۴۰۰-۲۸۰ میلیون کودک زیر ۵ سال را در کشورهای در حال توسعه تحت تاثیر قرار می دهد. شیوع اسهال ETEC همچنین در مواقع بلایای طبیعی مثل سیل و

همسانه سازی ژن مورد نظر در ناقل بیانی و بررسی بیان پروتئین زیر واحد اصلی جهت مطالعات بعدی در زمینه بررسی ایمنی سازی آن انجام شد.

### روش بررسی:

طراحی پرایمر برای ژن *CfaB* و انجام واکنش پلی میرزاسیون: برای طراحی پرایمر، توالی ژن مورد نظر از بانک ژنی NCBI (National Center for Biotechnology Information) استخراج و از نوکلئوتید ۷۰ تا ۵۱۳ (۶۰ نوکلئوتید ابتدای توالی مربوط به سیگنال پپتید می باشد) جهت این مطالعه انتخاب گردید. بعد از آنالیز نقشه محدودالانژ ژن *CfaB* با نرم افزار webcutter، جایگاه شناسایی آنزیم های *HindIII* و *XhoI* به ترتیب برای پرایمرهای پیشرو و پیرو در نظر گرفته شد. با کمک نرم افزارهای *oligo* و *DNAsis* طراحی پرایمر صورت گرفت، سپس اختصاصیت توالی پرایمرهای طراحی شده نسبت به توالی مورد نظر با کمک نرم افزار Blast بررسی گردید. این توالی ها توسط شرکت بایونیر کره جنوبی سنتز گردید. (در توالی های زیر جایگاه شناسایی آنزیم ها به صورت زیر خط نشان داده شده است). توالی پرایمر پیشرو:

5'TGTGTCAGTGAGTGCTAAGCTTGTAGAG3'

توالی پرایمر پیرو:

5'AATACTCGAGTCAGGATCCCAAAGTC 3'

باکتری ETEC (تهیه شده از آزمایشگاه رفرائنس، بیمارستان بوعلی) ابتدا به مدت یک شب در محیط کشت *Luria Bertinis* (LB) مایع و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد رشد داده شد. سپس ژنوم این باکتری با روش CTAB-NaCl تخلیص و سپس با استفاده از اسپکتروفتومتری تعیین غلظت گردید (۱۳). ژن *CfaB* ابتدا با آنزیم Taq پلی مرار (سیناژن) طی ۳۰ سیکل تکثیر گردید. این واکنش در غلظت ۳ میلی مولار  $MgCl_2$  و ۰/۴ پیکومول از هر پرایمر، ۰/۲ میلی مولار dNTPs و ۵۰ نانوگرم از ژنوم استخراج شده ETEC

کوچک بر مکانیسم های دفاعی روده کوچک غلبه می کند و سپس با ترشح انتروتوکسین های حساس به حرارت (LT) و مقاوم به حرارت (ST) منجر به تخریب مسیرهای انتقال پیام داخل سلول روده ای میزبان، تحریک روده و ترشح حجم زیادی از مایعات از روده و اسهال می شود (۵،۴). شواهد قابل توجهی وجود دارد که برای ایجاد مصونیت علیه این بیماری، فاکتورهای کلونیزاسیون می توانند مصونیت وسیع الطیف ایجاد کنند بنابراین طراحی واکسن بر اساس این فاکتورها ضروری به نظر می رسد (۶،۵).

مطالعات اپیدمیولوژیکی در نقاط مختلف جهان نشان داده است که از بین ۲۵ نوع فاکتور کلونیزاسیون شناسایی شده این ارگانیزم، فاکتور کلونیزاسیون نوع یک (CFA/I) اولین فاکتور کلونیزاسیون شناسایی شده و رایج ترین فاکتور کلونیزاسیون در سویه های ETEC محسوب می شود و سویه های بیان کننده این فاکتور در مناطق اندمیک آمریکای جنوبی و آسیا گسترده هستند (۷،۶). ژن این فیمبریه و توکسین مقاوم به حرارت بر روی پلاسمید NTP113 قرار گرفته است (۹،۸). بیان ۴ ژن *cfaABCE* دراپرون CFA/I برای مونتاژ فیمبریه ضروری است. از نظر ساختاری مولکول CFA/I یک رشته مارپیچ طویل متشکل از بیش از هزار زیر واحد اصلی *CfaB* متصل به یک یا چند زیر واحد رأسی فرعی آدهسیو *CfaE* می باشد. مطالعات اخیر نشان داده است که زیر واحد *CfaB* به عنوان زیر واحد اصلی فیمبریه نقش مهمی در اتصال باکتری به سلول های اپی تلیال روده ایفا می کند (۱۱،۱۰). بنابراین آنتی بادی مونوکلونال علیه این پروتئین قادر است از اتصال سلول های بیان کننده CFA/I به سلول های روده انسان جلوگیری کند (۱۲). همچنین زیر واحد اصلی به عنوان مشخصه آنتی ژنی فیمبریه محسوب می شود و کاندیدای مناسبی برای تولید واکسن می باشد (۶). این تحقیق با هدف تکثیر و سپس همسانه سازی و زیر

PCR دارای دنباله A خالص شده و ناقل pTZ57R/T به مدت ۸ ساعت در دمای ۱۶ درجه سانتیگراد انجام شد. بعد از انجام همسانه سازی، تراریختی پلاسمید نو ترکیب حاصل با روش شوک حرارتی به سلول های مستعد *E.coli* سویه DH5 $\alpha$  انجام گرفت و سپس این باکتری ها بر روی پلیت LB آگار حاوی Xgal-IPTG و آمپی سیلین (غلظت ۸۰  $\mu\text{g/ml}$ ) کشت داده شدند. بعد از گذشت مدت زمان ۱۲ ساعت کلنی های سفید و آبی رنگ مشاهده شدند. از ویژگی های این ناقل این است که جایگاه چند گانه همسانه سازی در وسط ژن  $\beta$  گالاکتوزیداز قرار گرفته است. قطعه همسانه سازی شده در این ناقل، در جایگاه چند گانه همسانه سازی آن جای می گیرد و بنابراین با غیر فعال شدن ژن  $\beta$  گالاکتوزیداز همراه است. بنابراین غربالگری سلول های حاوی DNA نو ترکیب با عدم توانایی آنها در ساخت آنزیم  $\beta$  گالاکتوزیداز صورت می گیرد. سویه های نو ترکیب دارای رنگ سفید و سویه های فاقد ناقل نو ترکیب، آبی رنگ بودند (۱۳).

برای تایید همسانه سازی ژن *CfaB*، از کلنی های سفید موجود بر روی پلیت برداشت شده و در محیط کشت مایع حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین (غلظت ۸۰  $\mu\text{g/ml}$ ) رشد داده و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی به طور مستقیم و با استفاده از کلنی، واکنش PCR انجام شد. برای این کار قسمتی از یک کلنی در ۵۰ میکرو لیتر آب مقطر همگن و در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه حرارت داده شد و پس از یک اسپین کوتاه، دو میکرو لیتر از مایع رویی به عنوان الگو در واکنش PCR استفاده شد. از کلنی های مثبت، پلاسمیدهای نو ترکیب با استفاده از روش لیز قلیایی تخلیص و واکنش هضم آنزیمی با آنزیم های XhoI و HindIII به مدت ۶ ساعت انجام گرفت. نمونه ها همراه با نشانگر وزن مولکولی الکتروفورز و مورد بررسی قرار گرفت (۱۳).

در دمای اتصال ۵۸ درجه سانتیگراد بهینه سازی گردید. سیکل های PCR شامل یک سیکل واسرشتی ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل شامل مراحل واسرشتی ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال پرایمر به رشته الگو در دمای ۵۸ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و تکثیر قطعه مورد نظر در دمای ۷۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و در پایان یک مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه بود. در نهایت محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردید.

به منظور تکثیر ژن هدف با صحت بالا برای استفاده در واکنش همسانه سازی، آنزیم پلی مرز با خاصیت غلط گیری بالا (Highfidelity) (از شرکت فرمنتاز) (مخلوطی از آنزیم های Taq پلی مرز و pfu) به کار برده شد. واکنش تکثیر در شرایط غلظت ۴ میلی مولار  $\text{MgCl}_2$  و ۰/۴ پیکومول از هر آغازگر، ۰/۲ میلی مولار dNTPs و ۵۰ نانوگرم از ژنوم استخراج شده ETEC در دمای اتصال ۵۷ درجه سانتیگراد بهینه سازی گردید. سیکل های PCR شامل یک مرحله واسرشتی ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ مرحله شامل مرحله واسرشته شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵۰ ثانیه، اتصال پرایمر به رشته الگو در دمای ۵۷ درجه سانتیگراد به مدت ۵۰ ثانیه و تکثیر قطعه مورد نظر در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه و در پایان، یک مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه بود. در نهایت محصول PCR جهت تایید به عنوان سوپسترا مورد هضم آنزیمی EcoRI قرار گرفت.

همسانه سازی ژن *CfaB* در ناقل pTZ57R/

محصول PCR با استفاده از کیت تخلیص DNA از ژل آگاروز (بایونیر) خالص سازی گردید. واکنش الحاق با کمک آنزیم T4 لیگاز برای محصول

زیر همسانه سازی ژن *CfaB* در ناقل بیانی *pET 28a*

بدین منظور ابتدا پس از تخلیص پلاسمیدهای (pTZ57R/T-cfaB) و پلاسمید بیانی pET28a با روش لیز قلیایی، واکنش هضم آنزیمی بر روی پلاسمید نوترکیب و همچنین پلاسمید بیانی، با آنزیم‌های محدودالثر *XhoI* و *HindIII* به مدت ۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه انجام گرفت. محصول PCR و ناقل pET28a برش خورده بعد از الکتروفورز بر روی ژل آگارز با دمای ذوب پایین (low melting)، با کمک کیت تخلیص محصول PCR (بایونیر) تخلیص شدند. واکنش الحاق در دمای ۱۶ درجه سانتیگراد به مدت ۸ ساعت انجام شد و فرآورده این واکنش با روش شوک حرارتی به میزبان *E. coli* سویه BL21DE3pLysS انتقال یافت. دو نوع واکنش هضم آنزیمی برای برش پلاسمیدهای نوترکیب به منظور تایید صحت زیرهمسانه سازی طراحی گردید. یکی از واکنش‌ها با آنزیم‌هایی که محل برش آن‌ها در پرایمرها قرار داده شده بود، انجام گرفت. واکنش هضم آنزیمی دیگری با آنزیم *EcoRI* که دارای یک جایگاه برش بر روی ناقل pET28a و یک جایگاه برش بر روی قطعه ژنی *CfaB* است، صورت گرفت. در نهایت برای اطمینان از صحت ترادف ژن، پلاسمید pET28a-cfaB تخلیص و برای تعیین ترادف به شرکت شاین ژن (چین) Shine Gene China ارسال شد.

بررسی بیان سازه ژنی *pET28a-CfaB*

از کشت شبانه سویه‌های نوترکیب واجد پلاسمید pET28a-cfaB میزان ۱۰۰ میکرولیتر به ۵ میکرولیتر محیط LB مایع حاوی کانامایسین (غلظت ۸۰ µg/ml) تلقیح گردید و پس از رسیدن جذب نوری محیط کشت در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۵ مورد القای ماده القاکننده پروموتور (IPTG) قرار گرفت.

به منظور تولید پروتئین نوترکیب، تغییر ۳ پارامتر غلظت IPTG، زمان و دما در شرایط بیان ژن هدف مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا بیان ژن مورد نظر

در غلظت یک میلی مولار IPTG و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، در زمان های ۲،۳،۵،۷،۱۲،۱۸ ساعت بررسی شد. سپس بیان ژن مورد نظر در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و زمان ۳ ساعت، غلظت های مختلف IPTG (۱،۰/۷۵،۰/۵،۰/۲۵) مورد بررسی قرار گرفت. بیان پروتئین نوترکیب در غلظت یک میلی مولار IPTG در دماهای (۲۵،۳۰،۳۷ درجه) صورت گرفت. همچنین با توجه به گزارش بیان ژن نوترکیب فاکتور کلونیزاسیون در محیط کشت CF اختصاصی (حاوی کازامینوئاسید، عصاره مخمر،  $MgSO_4$ ،  $MnCl_2$ ) و محیط کشت سوپر براث (حاوی عصاره مخمر ۲٪، کلرید سدیم ۰/۵٪، تریپتون ۳/۲٪) (۱۴) از این محیط ها برای بیان سازه ژنی pET28a-cfaB استفاده شد.

پس از انتقال پلاسمید مورد نظر به میزبان Rosetta و رشد این باکتری روی محیط انتخابی، شرایط بیان پروتئین برای این میزبان با استفاده از القاء کننده IPTG، فراهم گردید. این سویه، مشتقی از باکتری *E. coli* BL21DE3pLysS می باشد که دارای پلاسمیدی حاوی ژن های tRNA می باشد که می توانند اسید آمینه های مربوط به کدون های نادر را در *E. coli* تامین نماید. پس از آن باکتری‌ها با سانتریفیوژ دور ۵۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه، جمع آوری و سونیکاسیون (قدرت ۷۰٪ و پالس ۰/۷۵) انجام شد.

## الکتروفورز SDS PAGE

وزن مولکولی و محل قرارگیری پروتئین نوترکیب در نمونه های بعد از هر کدام از مراحل بالا و نمونه قبل از القای IPTG با استفاده از (SDS-PAGE) Sodium Dodecyl Sulphate- PolyAcrylamide Gel Electrophoresis، بررسی گردید. غلظت ژل ۱۲ درصد با جریان ثابت ۲۵ میلی آمپر بود.

بررسی وجود پروتئین مورد نظر در نمونه های بیانی با استفاده از ایمونوبلات:

به دلیل همسانه سازی توالی ژن مورد نظر در ناقل بیانی pET، پروتئین نوترکیب دارای دنباله

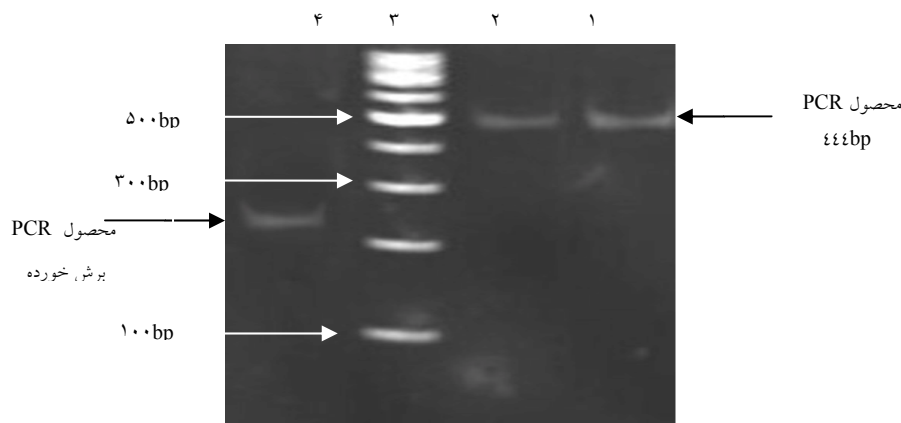
#### آنالیز بیوانفورماتیکی توالی *CfaB*:

بعد از بررسی بیان ژن مورد نظر در شرایط مختلف و عدم تولید پروتئین مورد نظر آنالیز بیوانفورماتیکی ژن مورد نظر انجام شد. آنالیزهای بیوانفورماتیکی ژن *CfaB* با استفاده از نرم افزارهای تحت شبکه به منظور بررسی محتوی G+C این ژن، وجود کدون های نادر، پایداری mRNA و همچنین شاخص سازگاری کدون (CAI) انجام گرفت.

#### یافته ها:

ژن کد کننده زیر واحد اصلی آنتی ژن فاکتور کلونیزاسیون (*CfaB*) بدون تداخل کد کننده سیگنال پپتید با کمک پرایمرهای پیشرو و پیرو تکثیر گردید. محصول PCR با دنباله A بر روی ژل با اندازه ۴۴۴ نوکلئوتید مشاهده شد. پس از هضم آنزیمی محصول با آنزیم *EcoRI*، قطعات ۲۱۶ و ۲۲۸ نوکلئوتید حاصل شد که به دلیل نزدیکی اندازه آنها به یکدیگر بر روی ژل به صورت یک باند مشاهده گردید (تصویر شماره ۱). ژن مورد نظر در ناقل pTZ57R/T همسانه سازی شد و به میزبان *E.coli* DH5α انتقال یافت. برای

هیستیدینی در ابتدای خود می باشد. بنابراین برای بررسی وجود پروتئین نو ترکیب در نمونه های بیانی از تکنیک ایمونوبلات با استفاده از آنتی بادی ضد His tag و آنتی بادی اختصاصی *CfaB* تولید شده در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک ایران استفاده شد. پس از تفکیک باندهای پروتئینی با الکتروفورز SDS-PAGE، با کمک سیستم وسترن بلاتینگ (Biorad) و بافر انتقال (گلاپسین ۳۹ میلی مولار، تریس ۴۸ میلی مولار، SDS ۳/۳ درصد و متانول ۲۰٪) روی کاغذ نیتروسلولز منتقل شد. کاغذ نیتروسلولز با استفاده از بافر PBST (بافر PBS با ۰/۰۵٪ توئین-۲۰) حاوی ۵ درصد شیر خشک در دمای اتاق به مدت ۲ ساعت بلاک گردید. نمونه پس از سه بار شستشو با بافر PBST به مدت یک ساعت با آنتی بادی AntiHis Tag با رقت ۱/۸۰۰۰ یا آنتی بادی Anti-CfaB با رقت ۱/۱۰۰۰ در بافر PBST در دمای اتاق مجاور شد و پس از شستشو با بافر PBST برای آشکار سازی از ده میلی لیتر بافر آشکار ساز (تریس ۵۰ میلی مولار حاوی ۶ میلی گرم دی آمینوبنزئیدین و ۱۰ μl آب اکسیژنه) استفاده شد. واکنش با کمک آب مقطر متوقف گردید (۱۵).



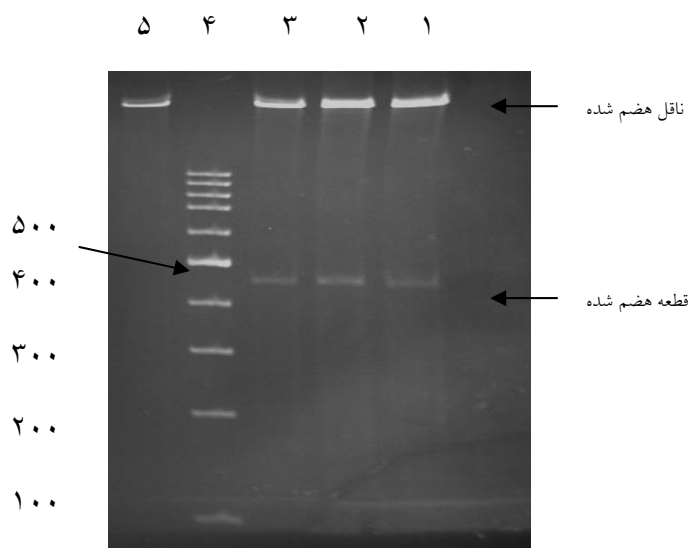
**تصویر شماره ۱:** محصول PCR ژن کد کننده زیر واحد اصلی آنتی ژن فاکتور کلونیزاسیون (*CfaB*) و تایید آن با استفاده از هضم آنزیمی (*EcoRI*)  
 ستون ۱، ۲: محصول PCR (۴۴۴ bp)، ستون ۳: مارکر (100bp DNA ladder)، ستون ۴: محصول برش خورده (۲۳۰ bp)

تایید همسانه سازی ژن *CfaB*، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، PCR مستقیم از کلنی انجام شد. برش آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب pTZ57R/T حاصل از الحاق، بر روی ژل الکتروفورز وجود قطعه ۴۴۴ نوکلئوتید تایید کرد (تصویر شماره ۲).

پس از تکثیر و تخلیص pTZ57R/T-CfaB و برش با آنزیمهای *Hind*III و *Xho*I قطعه برش خورده در ناقل بیانی pET28a زیر همسانه سازی گردید و به میزبان/شرشیا کلی سویه BL21DE3plysS انتقال داده شد. دو نوع واکنش هضم آنزیمی برای برش پلاسمید پس از تکثیر و تخلیص pTZ57R/T-cfaB و برش با آنزیمهای *Hind*III و *Xho*I قطعه برش خورده در ناقل بیانی pET28a زیر همسانه سازی گردید و به میزبان/شرشیا کلی سویه BL21DE3plysS انتقال داده شد. دو نوع واکنش هضم آنزیمی برای برش پلاسمید حاصل جهت صحت همسانه سازی طراحی گردید.

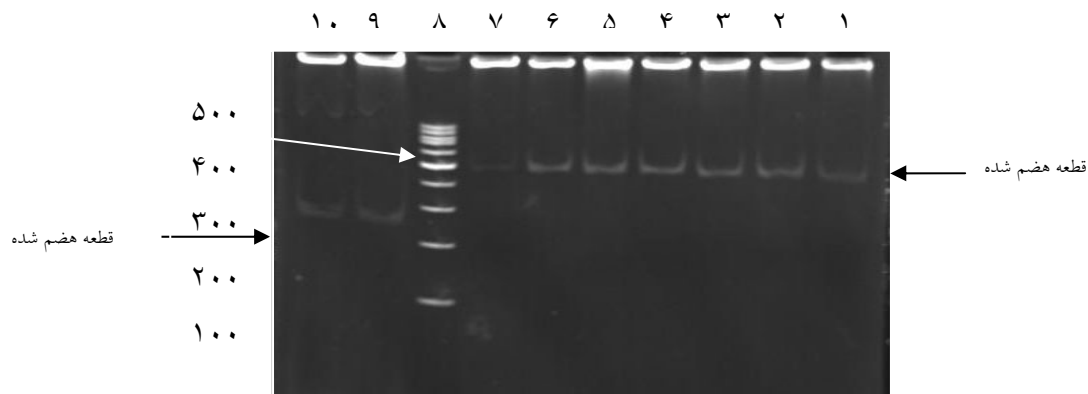
یکی از واکنشها با آنزیمهای *Xho*I و *Hind*III انجام و ژن هدف با اندازه ۴۴۴ نوکلئوتید بر روی ژل آگارز مشاهده گردید. واکنش هضم آنزیمی دیگری با آنزیم *Eco*RI که دارای یک جایگاه برش بر روی ناقل pET 28a و یک جایگاه برش بر روی قطعه ژنی *cfaB* است، انجام و قطعه‌ای با طول حدود ۲۳۰ نوکلئوتید بر روی ژل مشاهده گردید (تصویر شماره ۳). همچنین صحت ورود محصول نوترکیب در ناقل و عدم تغییرات نوکلئوتید در آن با تعیین توالی DNA تایید گردید.

به منظور بیان پروتئین نوترکیب، القای بیان پروتئین در دما و مدت زمان‌های مختلف و تحت تاثیر غلظت‌های متفاوت IPTG بررسی شد. همچنین بیان ژن مورد نظر در محیط کشت پیشنهاد شده برای بیان این ژن نظیر سوپر برات و محیط CF صورت گرفت و از باکتری Rossetta به منظور افزایش تولید پروتئین‌های نوترکیب استفاده شد. نتایج الکتروفورز SDS-PAGE



**تصویر شماره ۲:** آنالیز ناقل pTZ57R حاوی قطعه مورد نظر با استفاده از هضم آنزیمی (*Xho*I، *Hind*III)

ستون ۱، ۲، ۳: هضم آنزیمی ناقل دارای ژن مورد نظر (قطعه ژنی مورد نظر (۴۴۴ bp) و ناقل هضم شده)، ستون ۴: مارکر DNA (۱۰۰ bp)، ستون ۵: کنترل منفی (هضم آنزیمی ناقل بدون ژن مورد نظر)

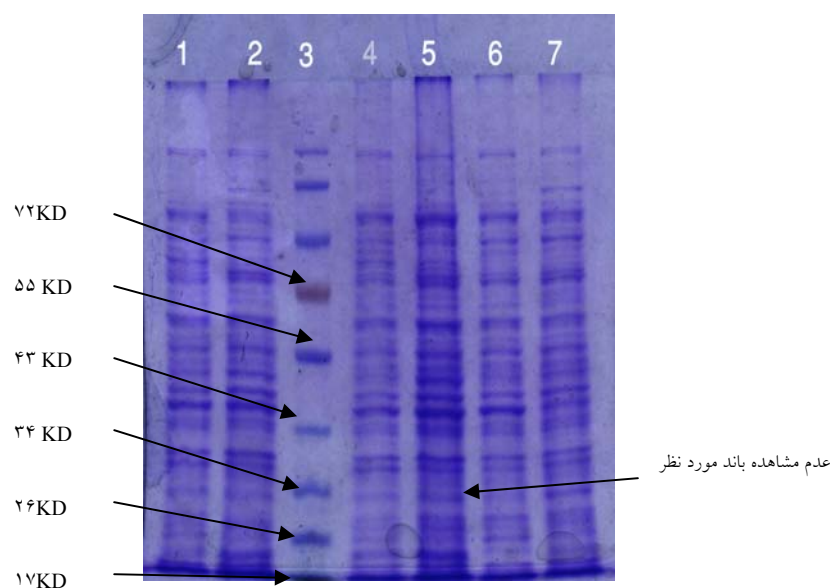


**تصویر شماره ۳: آنالیز ناقل PET28a حاوی قطعه مورد نظر با استفاده از هضم آنزیمی**  
ستون ۱-۷: ژن هدف (۴۴۴bp) و ناقل هضم شده PET28a با آنزیمهای *HindIII* و *XhoI*، ستون ۸: مارکر DNA (۱۰۰ bp)، ستون ۹، ۱۰: قطعه ۲۳۰ بازی حاصل از برش با آنزیم *EcoRI*

درصد می باشد. شاخص سازگاری کدون (CAI) از عوامل مهم بررسی بیان ژن در میزبان خارجی محسوب می شود که در مورد ژن CfaB این شاخص حدود ۰/۶ می باشد که نشان دهنده تناسب کم کدون های ژن CfaB نسبت به میزبان می باشد. این شاخص در ژن هایی که بیان بالایی دارند بین ۰/۹ تا ۱ می باشد.

حاکی از عدم بیان پروتئین نو ترکیب بود (تصویر شماره ۴) واکنش ایمونوبلات با آنتی بادی اختصاصی و آنتی بادی ضد His tag عدم تولید پروتئین نو ترکیب را تایید کرد.

آنالیز بیوانفورماتیکی ژن CfaB نشان داد، تکرارهای پشت سر هم از کدون های نادر در طول توالی وجود دارد و متوسط درصد GC تقریباً ۴۱



**تصویر شماره ۴: بررسی بیان پروتئین طبیعی نو ترکیب**  
ستون ۱، ۲، ۵، ۶: نمونه های بعد از القا و عدم مشاهده باند پروتئینی مورد نظر، ستون ۷: نمونه قبل از القا، ستون ۳: نشانگر اندازه پروتئین

## بحث:

به دلیل اهمیت *CfaB* در ایجاد مصونیت نسبت به بیماری اسهالی، در این مطالعه این ژن، در ناقل همسانه سازی و بیانی همسانه سازی گردید و بیان پروتئین نو ترکیب آن مورد بررسی قرار گرفت. برای تکثیر قطعه ژنی از آنزیم پلی مراز با خاصیت غلط گیری بالا (مخلوطی از دو آنزیم Taq پلی مراز و یک آنزیم با خاصیت غلط گیری) (فرمنتاز) استفاده شد. لازم به ذکر است که این آنزیم دارای صحت (۴ برابر آنزیم Taq به تنهایی) و کارایی زیاد می باشد و همچنین قطعه تکثیر شده دارای دنباله A خواهد بود که همسانه سازی مستقیم آن را در ناقل pTZ57R/T امکان پذیر می کند. در این تحقیق پس از طی مراحل زیرهمسانه سازی در ناقل بیانی (pET 28a) و بررسی بیان به این نتیجه دست یافتیم که تولید پروتئین نو ترکیب *CfaB* با وارد کردن توالی طبیعی این ژن در سیستم بیانی (pET 28a) امکان پذیر نمی باشد. در ابتدا به منظور بیان پروتئین، از سلول میزبان BL21 DE3 pLysS، استفاده شد. این میزبان به دلیل داشتن ژن کد کننده T7 RNA polymeras و عدم وجود پروتئینهای سلولی، برای تولید پروتئینهای نو ترکیب مناسب می باشد. اما با توجه به این که میزبان Rosetta (کد کننده tRNAهای مربوط به کدونهای کمیاب) بیان پروتئینهای دارای کدونهای کمیاب را افزایش می دهد (۱۶) و توالی طبیعی ژن *CfaB* دارای کدونهای کمیاب به صورت پشت سرهم می باشد، این احتمال وجود داشت که با انتقال ناقل نو ترکیب به این میزبان، پروتئین مورد نظر بیان شود. ولی با وجود تغییرات صورت گرفته در شرایط بیان در این مطالعه، بیان این پروتئین بر روی ژل SDS تایید نگردید. به علت اهمیت دما و ترکیب محیط کشت در بهینه سازی تولید پروتئین نو ترکیب، در این مطالعه به منظور بیان پروتئین نو ترکیب *CfaB* در ناقل بیانی pET28a، بیان توالی طبیعی این ژن در چند محیط کشت مناسب

(CF medium, LB, Superbroth) و دماهای مختلف (Rosetta, BL21DE3pLysS) و میزبانهای مختلف بررسی گردید. در مطالعه Yong-Fu Li و همکاران به منظور بیان پروتئین نو ترکیب از محیط Super broth استفاده شد و به نظر می رسد به علت بالاتر بودن درصد تریپتون و عصاره مخمر در این محیط کشت نسبت به محیط LB، برای تولید مطلوب پروتئینهای نو ترکیب مناسب می باشد (۱۷). Favre پروتئین نو ترکیب را در محیط کشت CF تولید کرد. این احتمال وجود دارد که این امر مربوط به وجود نمک در ترکیب این محیط کشت که به صورت تنظیم کننده هایی برای رونویسی از ژن مزبور عمل می کنند، باشد و باعث بیان پروتئین نو ترکیب به صورت مطلوب شده است (۱۴). در مطالعه ای *CfaB* در سه پلاسمید مجزا pkCMVintBL، pRE4، pkCMintPoly تحت کنترل پروموتورهای یوکاریوتی CMV (Rous sarcoma virus) RSV (Cytomegalovirus) همسانه سازی شد. در این مطالعه نشان داده شد که این ناقل ها به تنهایی قادر به تحریک پاسخ های ایمنی مخاطی (sIgA) نیستند (۱۸).

مطلب دیگری که مد نظر قرار گرفت نوع ناقل و پروموتور آن برای بیان این ژن در مطالعه ما بود. در سال ۲۰۰۴، مولکول *CfaB* (اسیدهای آمینه ۱۷۰-۲۴) در ناقل pMAL-p2، تحت کنترل پروموتور tac همسانه سازی شد. این پروتئین به صورت الحاق با Maltose binding protein (MBP) در میزبان BL21 تولید شد. با توجه به این که یکی از راهکارهای افزایش بیان پروتئین ها، الحاق ژن های آنها با ژن های با بیان بالا و تولید پروتئین های الحاقی می باشد، به نظر می رسد الحاق شدن *CfaB* با MBP باعث بیان این پروتئین شده است (۱۹، ۲۰).

در سال ۲۰۰۸، *cfaB* همراه با لینکر (DNKQ) به صورت الحاق با *CfaE* در pET24a همسانه سازی



مختلفی برای حل این مسئله اتخاذ کردند، یکی از این روش ها حذف کدون های کمیاب (rare codon) و تغییر کدون ها متناسب با کدون های متداول در *E.coli* می باشد (۱۱). از این رو با توجه به اینکه بیان پروتئین CfaB غیرممکن می باشد، در مطالعات بعدی از بهینه سازی کدون های نادر و سنتز توالی بهینه شده CfaB به منظور افزایش تولید پروتئین نو ترکیب استفاده خواهد شد.

### نتیجه گیری:

در طول توالی ژن CfaB کدون های نادر پشت سرهم وجود دارد که باعث کاهش بیان این پروتئین می شود.

### تشکر و قدردانی:

بدینوسیله از همکاری دکتر سید محمد موذنی و دکتر علی هاتف سلمانیان که در پیشبرد این تحقیق ما را یاری دادند تشکر و قدردانی می گردد.

شد و پس از تولید پروتئین به منظور بررسی ساختار، کریستالوگرافی گردید (۱۷). لازم به ذکر است بیان این ژن در ناقل pET24a گزارش شده است. این ناقل از نظر پروموتور و ساختار بسیار شبیه pET28a است با این تفاوت که فاصله میان ناحیه همسانه سازی ژن تا پروموتور pET24a در بسیار کم است که به علت عدم وجود توالی جایگاه اتصال به ریبوزوم (RBS) و توالی His Tag است (۱۶). این تفاوت ها این ناقل را برای رونویسی مناسب می سازد بدین مفهوم که ضرورت دارد برای بیان ژن در این ناقل، در توالی آن عناصر تنظیمی افزوده گردد. لذا با توجه به خصوصیات ژن و ناقل pET 24 a، به نظر می رسد از عناصر تنظیمی دیگر و شاید بهینه سازی کدون های نادر استفاده شده باشد که در این مقاله به آن ها اشاره نشده است.

مطالعات بیوانفورماتیکی ما نشان داد که کدون های کد کننده آمینواسید های ژن CfaB غنی از بازهای آدنین و تیمین و کدون های نادر می باشند و با توجه به بررسی انجام شده در این تحقیق بیان ژن، در سلول *E.coli* غیر ممکن می باشد. محققین روش های

### منابع:

1. Svennerholm AM, Tobias J. Vaccines against enterotoxigenic *Escherichia coli*. Expert Rev Vaccine. 2008; 7(6): 795-804.
2. Qadri F, Svennerholm AM, Faruque AS, Sack RB. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment and prevention. Clin Microbial Rev. 2005; 18(3): 465-83.
3. Wenneras C, Erling V. Prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli* associated diarrhea and carrier state in the developing world. Health Popul Nutr. 2004; 22(4): 370-82.
4. Enterotoxigenic *Escherichia coli*: advances in technical and laboratory aspects of research and development of vaccines: Wkly Epidemiol Rec. 2008 Mar 7;83(10):92-5
5. Fleckenstein JM, Harwidge PR, Munson GP, Rasko A, Sommerfelt H, Steinsland H. Molecular mechanisms of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. Microb Infect. 2010; 12(2): 89-98.
6. Walker RI, Steele D, Aguado T. Ad Hoc ETEC technical expert committee. Analysis of strategies to successfully vaccinate infants in developing countries against enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) disease. Vaccine. 2007; 25(14): 2545-66.
7. Wolf MK. Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 1997; 10(4): 569-84.

8. Nicklasson M. Studies on the expression and regulation of enterotoxins and colonization factors in enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). Inst Biomed Dep Microbiol Immun, Sweden. 2008.
9. Evans DG, Evans DJ, Clegg S, Pauley JA. Purification and characterization of the CFA: I antigen of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infect Immun. 1979; 25(2): 738-48.
10. MU XQ, Savarino SJ, Bullite E. The three-dimensional structure of CFA/I adhesion pili. Traveler's diarrhea bacteria hang on by a spring. J Mol Biol. 2008; 376(3): 614-20.
11. Jansson L, Tobias J, Lebens M, Svennerholm AM, Teneberg S. The major subunit, CfaB, of colonization factor antigen I from enterotoxigenic *Escherichia coli* is a glycosphingolipid binding protein. Infect Immune. 2006; 74(6): 3488-97.
12. Steinsland H, Valentiner-Branth P, Gjessing HK, Aaby P, Molbak K, Sommerfelt H. Protection from natural infections with enterotoxigenic *Escherichia coli*: longitudinal study. Lancet. 2003; 362(9380): 286-91.
13. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning laborator manual. NewYork: CSHL Press. 2001.
14. Favre D, Ludi S, Stoffel M, Frey J, Horn MP, Dietrich G. Expression of enterotoxigenic *Escherichia coli* colonization factors in *Vibrio cholera*. Vaccine. 2006; 24(20): 4354-68.
15. Bollage DM, Michel DR, Edeststein SJ. Protein method. NewYork: Wiley-Liss; 1996.
16. Lásaro MO, Alves AM, Guillobel HC, Almeida DF, Ferreira LC. New vaccine strategies against enterotoxigenic *Escherichia coli*. II: Enhanced systemic and secreted antibody responses against the CFA/I fimbriae by priming with DNA and boosting with a live recombinant *Salmonella* vaccine, Braz. J Med Biol Res. 1999 Feb; 32(2): 241-6.
17. Li YF, Poole S, Rasulova F, McVeigh AL, Savarino SJ, Xia D. Crystallization and x-ray diffraction analysis of several forms of the CfaB major subunit of enterotoxigenic *Escherichia coli* CFA/I fimbriae. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. 2009; 65(Pt 3): 242-7.
18. Lásaro MO, Alves AM, Guillobel HC, Almeida DF, Ferreira LC. New vaccine strategies against enterotoxigenic *Escherichia coli*. II: Enhanced systemic and secreted antibody responses against the CFA/I fimbriae by priming with DNA and boosting with a live recombinant *Salmonella* vaccine. Braz. J Med Biol Res. 1999 Feb; 32(2): 241-6.
19. Anantha RP, McVeigh AL, Lee LH, Agnew MK, Cassels FJ, Scott DA. Evolutionary and functional relationships of colonization factor antigen I and other class 5 adhesive fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infect Immun. 2004; 72(12): 190-201.
20. Sorenson HP, Mortensen KK. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. J Biotechnol. 2005; 115(2): 113-28.

## **Cloning, bioinformatics study and evaluation expression of gene of enterotoxigenic *Escherichia coli* CFA/I major subunit (CfaB)**

Ahsae Z (MSc)<sup>1</sup>, Salimian J (MSc)\*<sup>1</sup>, Nazarian Sh (MSc)<sup>1</sup>, Khalesi R (MSc)<sup>1</sup>, Olad GhR (MSc)<sup>1</sup>, Amani J (MSc)<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biological Sciences Dept., Imam Hosein University, Tehran, Iran.

Received: 23/Nov/2010

Revised: 30/Jan/2011

Accepted: 30/Apr/2011

**Background and aims:** Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) is the main cause of diarrhea in children in developing countries and also in travelers to these areas. ETEC attaches to host cells via filamentous bacterial surface structures, known as colonization factors. Epidemiological studies suggest that the prevalence of CFA/I is higher than other colonization factors. CFA expressed by ETEC and so represents an important component of any vaccine. Investigation supposed that CfaB as a major subunit of fimbriae is an appropriate candidate for vaccine preparation. In the present study we investigated cloning and expression of CfaB.

**Methods:** In this descriptive study, information about CfaB gene was obtained from gene bank and appropriate primers were designed accordingly. Genomic PCR reaction was performed and its product (CfaB gene) was cloned into pTZ57R/T cloning vector and then subcloned pET28a expression vector. CfaB gene expression was evaluated.

**Results:** Cloning was confirmed by using restriction enzyme and sequencing. Expression of recombinant protein was determined in different conditions (time, media, and host), but native gene inserted in pET28a was not expressed.

**Conclusion:** Native gene employs tandem rare codon which can reduce the efficiency of expression.

**Keywords:** Cloning, Colonization factor antigen I major subunit (CfaB), Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC).

**Cite this article as:** Ahsae Z, Salimian J, Nazarian Sh, Khalesi R, Olad GhR, Amani J. [Cloning, bioinformatics study and evaluation expression of gene of enterotoxigenic *Escherichia coli* CFA/I major subunit (CfaB). J Sharekord Univ Med Sci. 2011 Dec, Jan; 13(5): 72-82.]Persian

---

**\*Corresponding author:**

Biological Sciences Dept., Basic Sciences Faculty, Imam Hosein University, Tehran, Iran. Tel: 0098-09125757102, E-mail:jafarsalimyan@yahoo.com